

Лекция 9. Регуляторные последовательности.

Рис.2.

5'-концевые регуляторные последовательности
3'-концевые регуляторные последовательности
Энхансеры, сайленсеры и инсуляторы

Рис.3. Структура и функционирование прокариотического оперона и эукариотического гена

Рис.4. 5'-концевые регуляторные последовательности

Промотор - это последовательность, предшествующая кодирующей части гена, которую узнает фермент РНК-полимераза. Основным элементом промотора - место связывания РНК-полимеразы, которое она занимает перед началом синтеза РНК. В состав промоторов могут входить также участки связывания белков-регуляторов. Присутствует как у прокариот, так и у эукариот.

Помимо промотора у прокариот в составе оперона в 5'-концевой части присутствует **Оператор** – последовательность связывания белка-репрессора (который кодируется соответствующим геном). Если репрессор присоединен к оператору, то РНК-полимераза не может двигаться вдоль молекулы ДНК и синтезировать мРНК.

Промотор и оператор – проксимальные регуляторные элементы.

К 5'-регуляторным последовательностям относятся также дистальные элементы – **энхансеры**, а также во многих случаях – сайленсеры и инсуляторы.

Рис.5. Прокариоты

Различают несколько типов регуляции у бактерий.

В первую очередь – позитивный и негативный контроль. При позитивном контроле транскрипция оперона включается, при негативном – выключается. Ключевым регулирующим элементом при данном типе регуляции является оператор.

Рис.6. Прокариоты – промотор

У прокариот промотор включает ряд консервативных мотивов, важных для узнавания его РНК-полимеразой, в частности так называемые последовательности **-10** и **-35**. Промотор асимметричен, что позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию в правильном направлении и указывает то, какая из двух цепей ДНК будет служить матрицей для синтеза РНК. Промоторный участок в пределах оперона может частично перекрываться или вовсе не перекрываться с операторным участком цистрона (гена).

Рис.7. Прокариоты – оператор

В отличие от промотора, оператор представляет собой уникальную последовательность для связывания либо с белком-активатором (позитивная регуляция), либо с белком-супрессором (негативная регуляция).

Оператор *arg* оперона *E. coli*, известный так же как '*arg* Regulon'. Аргинин действует как ко-супрессор и связывается с белком-супрессором ArgR. Подавление транскрипции сильно зависит от концентрации аргинина в клетке.

Рис.8-10. Прокариоты – дистальные элементы

Долгое время полагали, что у прокариот отсутствуют дистальные регуляторные элементы – компактность генома прокариот не позволяет использовать обширные регуляторные последовательности. Однако помимо классической регуляции активности прокариотического оперона, которая подразумевает наличие только промотора и оператора, было также обнаружена энхансер-зависимая инициация транскрипции. Причем, синтез при различных вариантах регуляции осуществляется различными РНК-полимеразами.

Энхансер (ген-усилитель) – короткий сегмент ДНК, который влияет на уровень проявления (экспрессии) определённых генов, увеличивая частоту инициации и транскрипции.

Энхансер-зависимая регуляция транскрипции – довольно распространенное явление в царстве прокариот.

Рис.11. Эукариоты

5'-регуляторные участки эукариот по своему составу уникальны для каждого гена, однако, имеют общую структуру – промотор, проксимальные элементы и дистальные элементы.

Рис.12-14. Эукариоты – промотор

Транскрипция эукариотических генов осуществляется тремя РНК-полимеразами.

Основная масса генов транскрибируется при помощи РНК-полимеразы II.

Помимо ТАТА-боксов промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой II, содержат сайты связывания транскрипционных факторов, причем, набор различных сайтов связывания значительно варьирует для разных генов. Анализ генома человека показал наличие около 70 различных сайтов связывания транскрипционных факторов.

У *Drosophila melanogaster* существует большая группа промоторов РНК-полимеразы II, не содержащих ТАТА бокса. Было замечено, что для осуществления транскрипции с таких промоторов необходима область от +1 до +40 от старта инициации транскрипции. Она была названа DPE (Downstream Promoter Element).

Все промоторы дрозофилы удалось разделить на четыре группы:

- (i) ТАТА-содержащие;
- (ii) DPE-содержащие;
- (iii) содержащие и ТАТА и DPE;
- (iv) не содержащие ни ТАТА ни DPE.

rРНК, 5S РНК и 7SL РНК гены транскрибируются при помощи РНК-полимеразы III, промотор которой значительно отличается от промотора РНК-полимеразы II. В отличие от промоторов РНК-полимеразы II, промоторы РНК-полимеразы III – внутренние, то есть находятся в составе кодирующей части гена и транскрибируются.

Рис.15-16. Эукариоты – энхансеры

Энхансеры активируют транскрипцию. Энхансер-связывающие белки активируют транскрипционные факторы и медиаторы.

Энхансеры могут находиться на значительном расстоянии от точки инициации транскрипции.

Энхансеры очень разнообразны по последовательности, как и энхансер-связывающие белки. Зачастую, чтобы определить наличие энхансера, его расположение и последовательность необходимо прибегать к множеству экспериментов с использованием транспортерных генов, которые позволяют выявлять функциональные элементы регуляторных областей. Для большинства генов истинный размер дистальной регуляторной области остается неизвестен.

Помимо экспериментальных данных используются также биоинформатические подходы, которые основаны на поиске ортологов у родственных организмов. Некоторые энхансеры ортологичных или гомологичных генов позвоночных – весьма консервативные последовательности, что позволяет проводить их поиск у разных организмов.

Рис.17. Эукариоты – сайленсеры

Сайленсеры, в отличие от энхансеров, блокируют транскрипцию.

Рис.18-19. Эукариоты – инсуляторы

Инсуляторы — особые регуляторные элементы, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения. Эта функция инсуляторов включает два различных направления. Во-первых, они блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находится между ними. При этом инсулятор выполняет только разделительную функцию и не влияет на активность энхансера и промотора. Во-вторых, инсулятор выполняет барьерную функцию для распространяющегося конденсированного хроматина. Показано, что существуют инсуляторы, как выполняющие одну из двух функций, так и обе.

Тот факт, что инсуляторы могут влиять на энхансер-промоторные взаимодействия может быть рассмотрен в контексте роли этих последовательностей в модулировании функций энхансера. Энхансеры не обладают специфичностью действия, следовательно, у эукариот должны были выработаться механизмы, обеспечивающие невозможность активации генов в ненужном месте или в ненужное время развития энхансерами соседнего гена. Активность инсуляторов регулируется при помощи РНК-интерференции. (А) Два инсулятора связаны друг с другом при помощи инсулятор-связывающих белков. (В) Специальный белок Rm62 связывает как инсулятор-белковый комплекс, так и двухцепочечную РНК, что приводит к разрушению комплекса двух инсуляторов.

Рис.20. 3'-концевые регуляторные последовательности

3'-концевые регуляторные последовательности гораздо менее разнообразны и менее изучены, чем 5'-концевые регуляторные последовательности. К 3'-регуляторным последовательностям относятся:

Терминатор - последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как сигнал к прекращению элонгации и сигнал к диссоциации транскрипционного комплекса. Терминаторы транскрипции, функционирующие с разной эффективностью, могут находиться и внутри транскриптов. Такие терминаторы являются факторами, регулирующими уровень транскрипции (и других этапов экспрессии) соответствующих генов. Для осуществления терминации транскрипции на некоторых терминаторах РНК-полимераза не требует дополнительных белковых факторов, тогда как другие терминаторы в их отсутствие не функционируют.

Сайленсеры, энхансеры и инсуляторы, располагающиеся в 3' области генов.

Лучше всего терминация транскрипции и терминаторы изучены у прокариот.

У бактерии бактерий есть два механизма терминации транскрипции:

- ро-зависимый механизм, при котором белок Rho (ρ), который дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК.

- ро-независимый, при котором транскрипция останавливается, когда только что синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов, что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК.

Рис.21. Прокариоты – терминатор